

Title	乳腺腫瘍患者の尿中エストロン, エストラジオール分割の消長について
Author(s)	栗田, 昌治
Citation	日本外科宝函 (1959), 28(5): 1784-1806
Issue Date	1959-06-01
URL	http://hdl.handle.net/2433/206887
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	publisher

乳腺腫瘍患者の尿中エストロン，エスト ラジオール分劃の消長について

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：青柳安誠教授）

栗 田 昌 治

（原稿受付：昭和34年6月1日）

STUDIES ON THE EXCRETION OF URINARY ESTRONE AND ESTRADIOL FRACTION IN PATIENTS WITH NEOPLASTIC DISEASES OF THE BREAST

by

SHOJI KURITA

From the 2nd Surgical Division, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. YASUMASA AOYAGI)

Urinary estrone and estradiol fractions of normal female and patients with neoplastic diseases of the breast were determined by modified BROWN's method. The concentration of urinary estrone and estradiol fractions in 43 patients with neoplastic diseases, especially with chronic cystic mastitis (mastopathia) and carcinoma of the breast were compared with the values in 9 normal women. The results obtained were as follows.

The presence of excessive excretion of estrone and estradiol was unexpectedly few in whole patients with neoplastic diseases. The excretion of estrone and estradiol in 62% of the patients with chronic cystic mastitis was within normal range, and even the value at the peak did not show a particular increase of excretion but the excretion cycle of the patients was atypical and the peaks of both estrone estradiol were found at earlier or later stadium than normal. The excretion of estradiol in 38% was low and excretion curves were atypical and excretion values in most of the patients were under 10 γ . It seems to be due to an ovarian dysfunction.

In general, the excretion of estradiol showed more atypical than estrone and in the comparison with estradiol excretion curves that were investigated by co-worker MATSUI, there were no remarkable differences.

In more than half of the patients with carcinoma of the breast, excretion of both estrone and estradiol showed atypical curves. Even in the few patients with typical excretion curves, the peak values of both estrone and estradiol were less than 20 γ , and particularly the values of estradiol in most patients were under 10 γ , and even the values of estrone plus estradiol showed low level under 30 γ , in 95% of the patients with cancer of the breast.

The excretion cycle in most patients with cancer of the breast showed that the

interval between the first peak at the time of ovulation and the second peak at the height of corpus luteum function were too wide or too narrow. The excretion curves of estriol in the patients with cancer of the breast were more atypical than those of estrone and estradiol, and its excretion values were low.

In general, hypoeestrogenism was conspicuous in the patients with cancer of the breast.

From the results of these observation, it can be concluded that some functional or organic disturbances in the sexual gland and the metabolic disturbances of estrogens may occur in the patients with neoplastic diseases.

目 次

緒 言	IV 補 正 式
第1章 Estrogen の蛍光	小 括
Ⅰ 結晶 Estrogen の蛍光反応	第3章 尿中 Estrone, Estradiol 各分割の排泄値
Ⅱ 結晶 Estrone の蛍光	Ⅰ 健常婦人
Ⅲ 結晶 Estradiol の蛍光	Ⅱ 妊 婦
第2章 Estrone, Estradiol 分割の測定法	Ⅲ マストバチー患者
Ⅰ Estrone, Estradiol の Column Chromatography	Ⅳ 乳癌患者
Ⅱ 尿中 Estrone, Estradiol 分割の抽出法	小 括
Ⅲ 回 収 率	総括および考察
	結 語

緒 言

乳腺腫瘍患者の尿中 Estrone-Estradiol 分割に関しては、すでに当教室の増田、西谷が Jailer-Finkerstein の方法を改良して Fluorophotometer による比較的方法を用いて、マストバチー患者では Estrone-Estradiol 分割の排泄曲線が不規則なものが多く尿中排泄量の絶対値は必ずしも高くはなく、むしろ正常範囲もしくは低下しているものが多いことを指摘した。しかしこの場合の測定値は、Estrone-Estradiol 分割の総和を Estrone を標準として測定したもので、Estrone, Estradiol 各分割を別々に定量したものではない。しかし尿中には Estrone, Estradiol のほかに Estriol も存在し、これらの各 Hormone は化学構造式が多少異っていると同時に発情作用も強弱の差がある。乳腺腫瘍患者の尿中でこれらの各分割はそれぞれ平行して増減するものか、あるいは1つの分割だけに異常排泄がおこっているものかについては報告されていない。そこでわれわれは、この点を検索する目的で Chromatography を用いて尿中 Estrogen 各分割の消長を測定したのである。

なお、Estriol は協同研究者松井が担当したので、こゝでは Estrone, Estradiol 分割について報告する。

第1章 Estrogen の蛍光

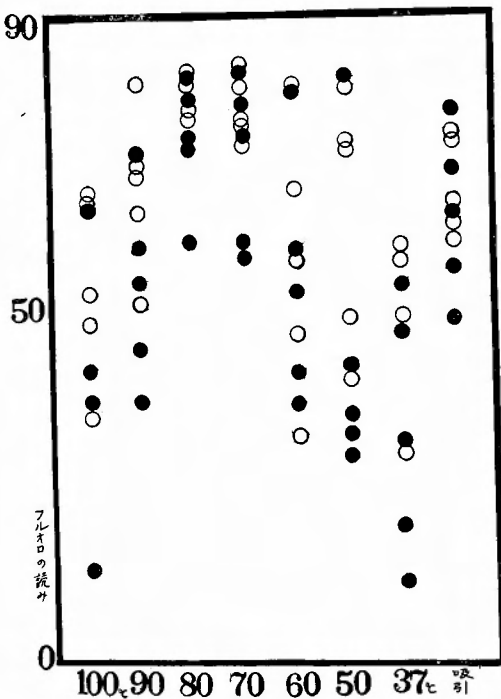
Ⅰ 結晶 Estrogen の蛍光反応

Estrogen の蛍光反応発色剤としては、Jailer, Bates 等の硫酸を用いる方法と、Finkerstein, Braunsberg 等の磷酸を用いる方法があり、後者の磷酸法は Estradiol だけに強く現われ、不安定であり採用されておらず、現在専ら硫酸法が採用されている。硫酸法もその濃度、作用時間によつて反応条件が異なることが報告されているが、Jailer は60~70%硫酸 8.0cc を加え10分間加熱し、Bates, Cohen は0.1cc のエタノールに90%硫酸1.0ccを加えて80℃10分加熱し、蛍光発現後65%硫酸6.0ccを加える2段階操作を用いている。すなわち、エタノールを蒸発させた後の乾固物に硫酸を加える方法と、エタノールを蒸発させないで硫酸を加える方法との2つがあるわけである。Bates はエタノールを蒸発させると蛍光が不安定になるとして反対しているが、西谷はエタノールにはなるほど蛍光促進作用があり、Fluorophotometer の読みが高く測定には一見便利なようであるが、その反面、不純物の蛍光も同時に高く現われるので、やはりエタノールを蒸発させた後の乾固物に硫酸を作用させた方がよいと主張している。われわれもこの点について再検討したが、やは

り西谷の主張のように、エタノールを蒸発させたものに硫酸を加えた方がよいことを再確認した。しかしエタノールを蒸発させると、Bates のいうように蛍光が不安定になる傾向があるので、この点を検討することにしたのである。

われわれはエタノールを蒸発させるさいに、その温度と時間とが蛍光の発現に影響をおよぼすのではないかと考え、エタノール蒸発温度、時間について検討した。まず、1.0γ の Estrone を含むエタノール溶液を 1.0cc づつ試験管にとり、外から内部を透見できる乾燥器、あるいは孵卵器に入れてそれぞれ 100°C, 90°C, 80°C, 70°C, 60°C, 50°C, 37°C でエタノールを蒸発させた資料について硫酸を加えて発現した蛍光を比較した。その成績は第1図のようである。

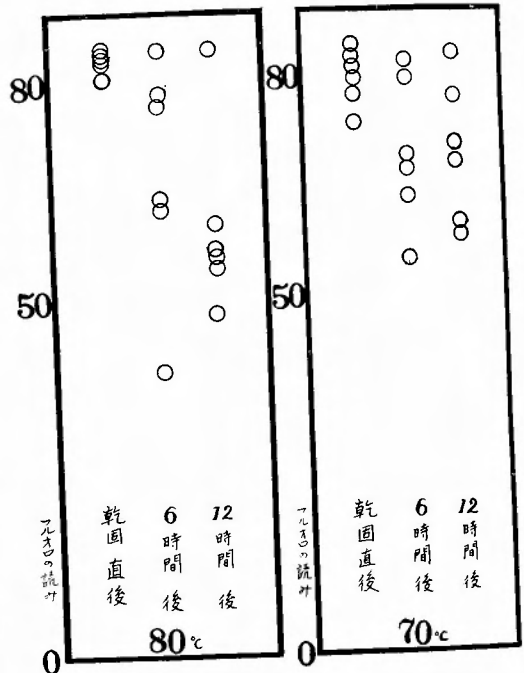
第1図 エタノール乾固温度と Estrone 蛍光
○ 太口試験管 ● 細口試験管



白丸は直径3.0cmの太口、黒丸は1.3cmの細口試験管であり、乾固時間は細口は太口の2倍以上であった。次に蒸発時間を短縮するために装置で10分間吸引した場合の成績は、太口試験管の方が細口より蛍光が安定であったが、蛍光はやや少なかった。すなわち、同じ温度でも乾固時間を速くした方が安定であり、温度は70~80°Cが最適であり、それ以上またはそれ以下

では蛍光発現が悪く、さらに時間的に一番速い吸引乾固は安定性はあるが蛍光が劣ることを確かめた。

第2図 エタノール乾固時間と Estrone 蛍光



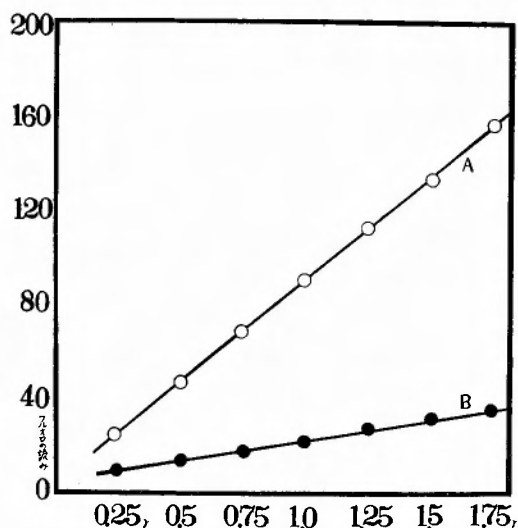
次に第2図のように乾固後そのまま同温で放置すると、80°C, 70°Cの場合でも、乾固後6時間~12時間の範囲内では、蛍光はやはり不安定となることを確かめた。

以上の結果から、エタノール乾固は70~80°C、とくに70°Cが最適で、太口試験管で乾固し、なるべく乾固後早く取出すことが一番よい方法であることを確かめた。

II 結晶 Estrone の蛍光

Estrone の蛍光については、すでに西谷のいうように、70% 1.0cc の硫酸で80°C 20分加熱し、65%硫酸11.0cc で稀釈する方法が最適条件であることを確かめた。なお、このさいの蛍光は第3図のように、われわれが用いた Pfaltz 製 Fluorophotometer の読みは Lamp filter として 435mμ のものを用いた時 (B₂ Permanent Standard Glass の読みは35) は 90, 365mμ のものを用いたさい (UVD フィルターで B₂ Standard の読みは11に調節) のいわゆる不純蛍光は20, 純蛍光はやく70であった。

第3図 Estrone の蛍光



A Lamp filter Photocell filter
 Corning 5113) Corning 3486
 Corning 3389) Corning 9780
 (最大波長 435m μ) (最大波長 540m μ)
 B Corning 5840 + 同上
 (最大波長 365m μ)

III 結晶 Estradiol の蛍光

結晶 Estradiol をエタノールに溶解, 均等化して 1 γ /1cc とし, それぞれ 1.0cc づつ分注, 前記の要領で乾固した試料について系統的に検討した。なお, 測定時のフィルターは一次フィルターに Corning 5113, 3389 (最大波長 435m μ) を, 二次フィルターには Corning 3486, 9780 (最大波長 540m μ) を用い, 不純蛍光には UVD フィルター (最大波長 365m μ) を一次フィルターに置換して測定し, 前者は B₂ Standard 35, 後者は 11 に調節, Cupette は 15cc のものを使用した。

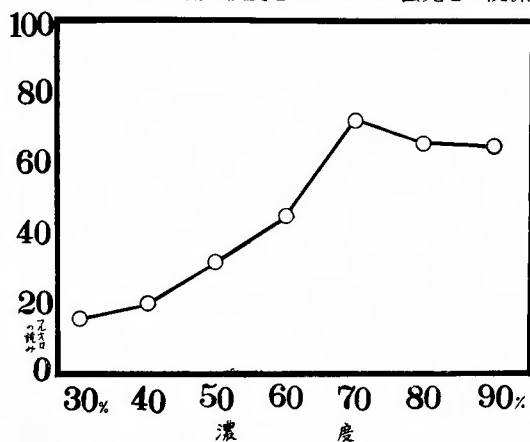
A 加熱硫酸濃度と蛍光反応

上述の Estradiol 乾固試料に 30~90% (V/V) の硫酸をそれぞれ 15cc づつ加えて 80°C, 20 分加熱した結果は第 4 図のように 70% 硫酸を加えた時が最も高く, その他はいづれも減少した。したがって, 硫酸の濃度は 70% が最適であることを知った。

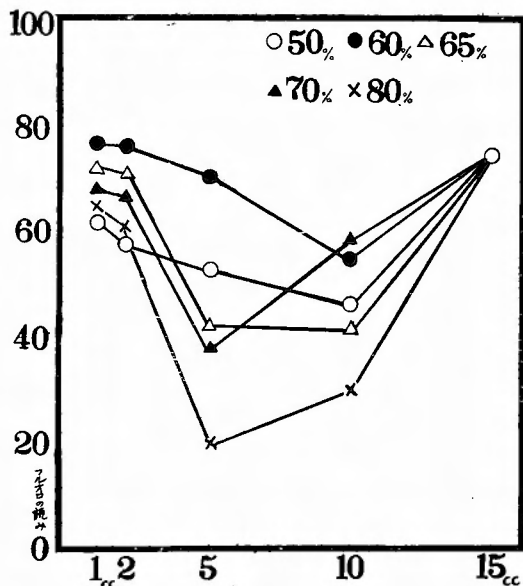
B 70% 加熱硫酸の量, および希釈硫酸濃度と蛍光反応

Estradiol 乾固試料に 70% 硫酸をそれぞれ 1.0, 2.0, 5.0, 10.0cc 加えて 80°C, 20 分加熱し蛍光を発生させた後さらに 50, 60, 65, 70, 80% 硫酸をそれぞれ加えて全量を 15.0cc とし, 測定した結果は第 5 図のように 70%

第4図 加熱硫酸濃度と Estradiol 蛍光との関係



第5図 加熱70%硫酸の量と希釈硫酸濃度と Estradiol 蛍光との関係

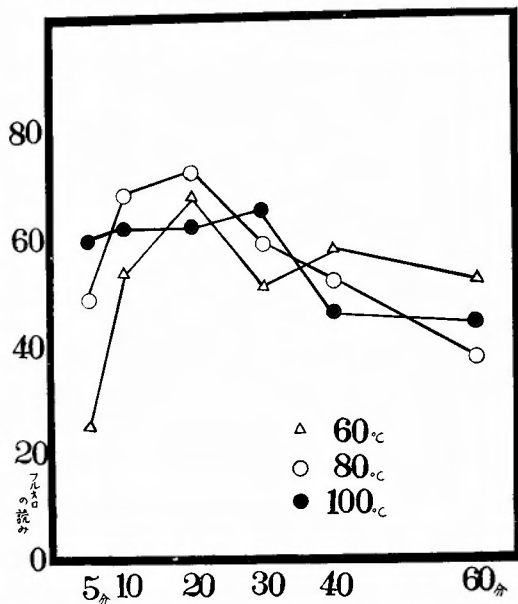


加熱硫酸量は少ないほど強く, 希釈硫酸の濃度はあまりいじりしき差はないが 60% が最も高い値を示した。

C 加熱温度および時間と蛍光反応

Estradiol 乾固試料に 70% 硫酸 1.0cc を加え, それぞれ 60°C, 80°C, 100°C 温浴中で 5~60 分加熱し, それぞれを 60% 硫酸 14.0cc で希釈した後, その蛍光を測定した結果は第 6 図のように 60°C, 10 分以内では蛍光発現は極度に悪く, 20 分で最高となり, 以後漸次低下し, 80°C では 20 分で最高, また 100°C では 5~60 分まで大差がなかった。故に加熱温度は 80°C, 加熱時間は 20 分が

第6図 加熱温度と時間と Estradiol 蛍光との関係



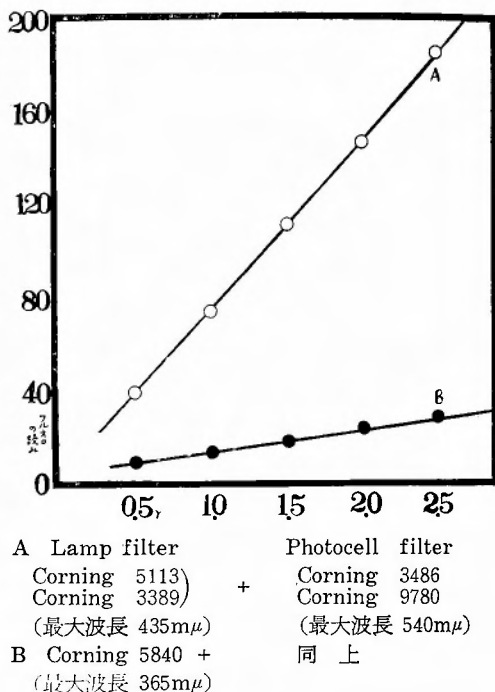
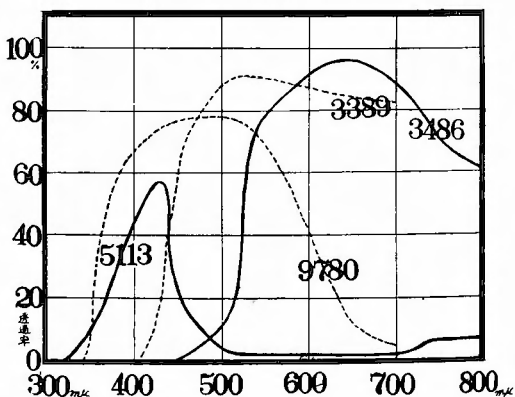
最適であることを知った。

以上の成績から、Estradiol の蛍光は溶媒蒸発後の乾固物に70%硫酸1.0cc を加え、80°C 温浴中で20分加熱、冷却後、60%硫酸14.0cc で稀釈する方法が最も安定かつ盲蛍光の発現が少ないことを確認した。そこでこの条件で測定した結晶 Estradiol の蛍光は第7図に示すように、結晶 Estradiol 1.0γ の Fluorophotometer の読みはほぼ60であった。

IV フィルターについて

前述の蛍光反応を尿抽出物に行つたさい、抽出にさいし分離不可能の Estrogen 以外の物質が硫酸と反応して淡褐色となる事があり、同時に若干の青白い不純蛍光を発する事実を経験する。これを除くために Bates, Cohen 等は最大波長が422mμ の一次フィルターと522mμ 附近に狭い巾をもついわゆる干渉フィルターに480mμ 以上に高い透過率をもつ補助フィルターを組合せたものを二次フィルターとして用いている。この方法によると、この不純蛍光はほとんど無視できるのであるが、このような干渉フィルターは残念ながら入手できなかったため西谷の報告したように、2つのフィルターの併用によって不純蛍光を除外した。すなわち第8図のように Pfaltz 製 Fluorophotometer では一次フィルターに Corning 5113, 3389 (最大波長435mμ), 二次フィルターに Corning 3486,

第7図 Estradiol の蛍光

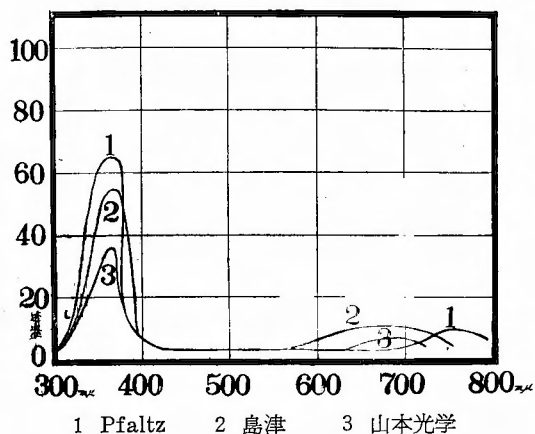
第8図 Pfaltz 社VB₂用フィルター

9780 (最大波長540mμ) を用いることが Estrogen 蛍光の特性をほぼ満足し、これを総蛍光とみなし、また第9図のように Corning 5840 (いわゆる UVD フィルターで最大波長365mμ) にかえた時の読みを Estrogen 以外の不純蛍光とみなし、これを差し引いた値を Estrogen の総蛍光としたのである。

第2章 Estrone, Estradiol 分割の測定法

1955年, Edinburgh 大学の Brown は Clayton

第9図 UVD フィルター



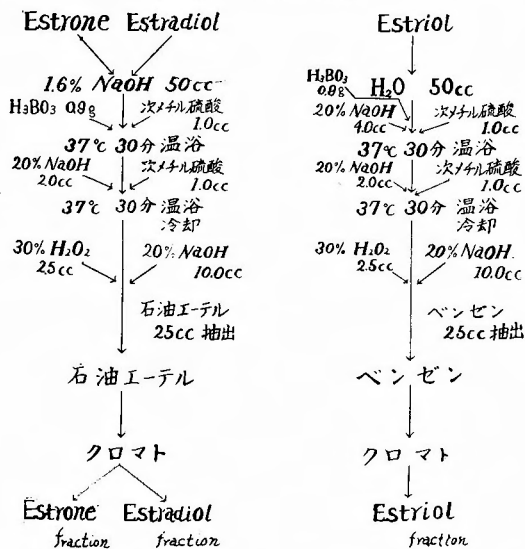
(1949)の実験にもとづいて尿中のフェノール分割をメチル化し、これを比色計で定量する方法を報告しているが、われわれはこれに準じ、比色法を蛍光法に切換えて測定するために次のような基礎実験を行った。

必要な試薬は苛性ソーダ、硼酸、次メチル硫酸、過酸化水素、石油エーテル、ベンゼン等である。石油エーテルは一級品を1%硫酸鉄液で洗滌し、沸点40~60°Cを採取し、ベンゼンも78°Cで蒸溜、次メチル硫酸は沸点184°Cで蒸溜したものを用いた。

I Estrone, Estradiol の Column Chromatography

第1表のようにフラスコに1.6% NaOH 50ccをとりこれに Estrone, Estradiol のエタノール溶液を注入

第1表 基礎実験方法



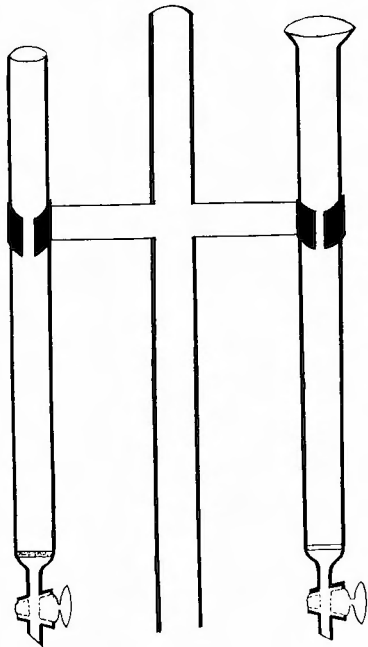
し、 H_3BO_3 0.9g, 次メチル硫酸1.0ccを加えてこれが完全に溶解するまで振盪する。他のフラスコに蒸留水を50cc注入し、Estriolのエタノール溶液を注入して20% NaOH 4.0ccと H_3BO_3 0.9g, 次メチル硫酸1.0ccを加えじゆうぶん振盪する。完全に溶解すると、37°C温浴中で30分間加温し、これに20% NaOH 2.0cc, 次メチル硫酸1.0ccを追加してさらに37°C 30分温浴、または一晩放置してメチル化する。温浴したものはこれを冷却し、30% H_2O_2 2.5cc, 20% NaOH 10ccを加え、Estrone, Estradiol を含む前者を25ccの石油エーテルで抽出し、10ccの蒸留水で洗滌する。そしてこれをColumnで展開する。すなわち、クロマト管による吸着 Chromatography を用い、吸着剤は活性アルミナを使用した。これは周知のように、アルミナ末の持つ吸着力を応用して、しかも、これは対する物質によって異なる吸着性をもっているという性質を利用してこれらの物質を分離しようとするものである。第10図のように、われわれの用いた Column は内径 13mm 容量35ccの細長いガラス管で、下部は漏斗状に細く突起があり、先端近くに括栓があり、管底にガラスフィルター (No.2) を所有し、括栓はこれを展開時ほぼ2秒間1滴に調節する。また第11図のように、Column は石油エーテル、またはベンゼンで一部みだし、ここに適量の水を加えた活性アルミナ末2.0gを静かに落下積層する。アルミナ末は液層落下とともに含まれている空気は上昇し(C), アルミナ末は管底のガラスフィルター(A)上に層を形成し(B), 一部は壁に附着するから管壁を静かにたたいて落下させる。次に括栓を開いて液層が減少すると、ふたたび管口から液を静かに注入してアルミナ末を壁から完全にアルミナ層へ貯積させるのである。

このようにして、アルミナ末の充填がおわるとガラス片(D)を投入して重しの役をさせ、次からの溶剤投入にさいしてアルミナ末の攪乱を防ぐ。次に Estrone, Estradiol 含有液を注入してその上面がアルミナ層上部のガラス片層上部まで減少すると、すぐに次の展開液を流しこみ展開を開始する。そして常にアルミナ層に溶剤がきれないように注意した。

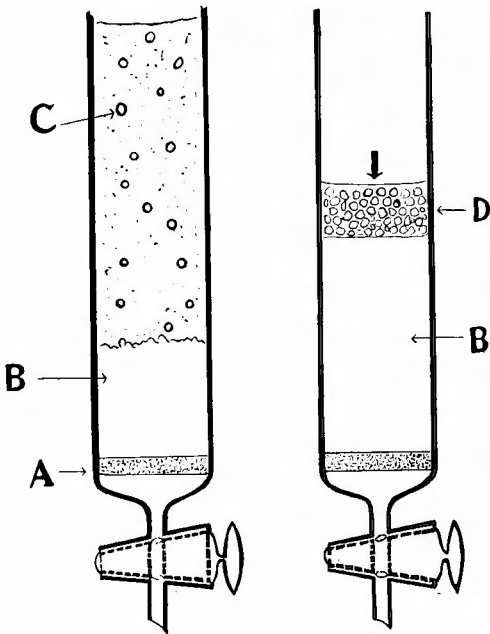
展開溶剤として25%ベンゼン石油エーテル12cc, 40%ベンゼン石油エーテル25cc, ベンゼン 15ccを用いた。

吸着剤としてわれわれは和光の活性アルミナ (200 mesh) を使用したが、このさいアルミナの活性度が問題になる。すなわち、展開を円滑にするためには適

第10図 クロマト・カラム



第11図 クロマト・カラムの充填



第 2 表

Eluate	Benzen petroleum ether								Benzen		
%	25		40						100		
cc	12		15			10			15		
	No.1 6	No.2 6	No.3 5	No.4 5	No.5 5	No.6 3.3	No.7 3.3	No.8 3.3	No.9 5	No.10 5	No.11 5
ALUMINA 2g + H ₂ O 0.2cc	0%	2	36	50	12	0	0	1	15	68	16
ALUMINA 2g + H ₂ O 0.18cc	0%	0	25	59	16	0	0	0	8	52	40

量の水を加えて活性を一定にする必要があるものでこれをアルミナの Standarisation といっている。このさいアルミナ末に水を加えてまぜるとわづかの熱を発するが、これをじゆうぶんに均等化してから使用する。また、市販品をそのまま用いると吸湿していますで幾分か水分を含んでいるため、われわれは入手したアルミナをデシケーター中で完全に乾燥した後 Standarisation を行つて使用した。

測定成績は第2表のように、アルミナ末 2.0g に蒸溜水を 0.2cc 加えて展開すると、アルミナ層に吸着された Estrone, Estradiol は25%ベンゼン石油エーテル12ccの後半の 6.0ccで2%が、40%ベンゼン石油エーテル25ccではその最初の5ccで36%、次の5ccで50%、最後の 5cc では12%の Estrone が溶出し、次の 6.6cc

では溶出がおこらず、最後の3.3ccで Estradiol の1%が溶出、次にベンゼン15ccで展開すると、初めの5ccで15%、次の5ccで68%、最後の5ccで16%の Estradiol が溶出する。次に蒸溜水0.18cc をアルミナ末に加えて展開すると、25%ベンゼン石油エーテルでは全然展開はおこらず、40%ベンゼン石油エーテル15ccで Estrone、次の 10cc では展開はなく、最後のベンゼン 15cc で Estradiol の100%が溶出する。この溶出液を乾固するわけであるが、これは電気フィルター温浴で行い、粘土とカオリンを混ぜて焼きあげた沸騰石の小片を投入すると蛍光になんの支障もなく速かに乾固することができた。なお、じゆうぶん乾固するためにわれわれは電気吸引器で吸引して完全に乾固させた。

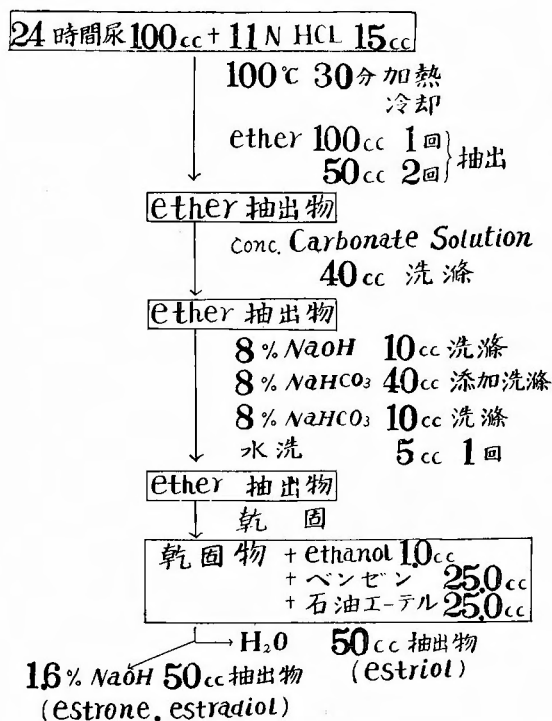
以上の成績から、Estrone, Estradiol 分割は9%の

割合に水を加えたアルミナ末を使用して展開することが最適であると考える。

II 尿中 Estrone, Estradiol 分割の抽出法

前述のような吸着 Chromatography を用いて尿中から Estrone, Estradiol 各分割を抽出したのであるが、そのさい用いたエーテルは化学用エーテルを1%硫酸鉄液で洗滌した後蒸溜し、またNaHCO₃、塩酸はすべて特級品を用いた。飽和 Carbonate Solution は8% NaHCO₃ 1l に20% NaOH 150ccを加えてpH 10.5に調整したものを使用した。その他の試薬は前項で述べたとおりである。

第3表 実験方法



以下 第2表

第3表に示すように人尿24時間尿をじゅうぶん混ぜて均等とし、100ccをとつてまず11N塩酸15ccを加え100℃30分加水分解した。尿中においてグルクロン酸または硫酸との結合型として存在している Estrogen はこれによつて遊離型となる。この加水分解尿は冷却後、尿中から Estrogen を抽出するのに最も適した溶媒であるエーテル100ccで1回、50ccで2回抽出し、Carbonate Solution 40ccで5分間洗滌して Acid fraction を除き、8% NaOH 10ccで洗滌、着色物質を除

く、このさい同時に NaOH に移行した Estrogen のいくつかを次の8% NaHCO₃ 40ccで追洗洗滌することによつてふたたびエーテル層へ逆行させる。さらに8% NaHCO₃ 10ccで洗滌してエーテルに多少残っているアルカリを中性化して次の5ccの水洗の時の Estriol の脱出を防止する。次にエーテル層をフラスコにとり蒸発乾固する。このさい、底の赤褐色の乾固物は Steroid hormone, Progesterone などを含んでいるが、これにエタノール1.0ccを加えて溶解し、さらに石油エーテル、ベンゼンをそれぞれ25ccづつ加え、これを蒸溜水50ccで抽出する。この水抽出物は Estriol を含んでいる。さらに1.6% NaOH 50ccで抽出するとこれに Estrone, Estradiol が移行するのである。すなわち、この段階では Neutral fraction と Phenol fraction との分離と同時に強フェノール (Estriol) と弱フェノール (Estrone, Estradiol) の分離が行われ、この Estrone, Estradiol を含む液を前項で述べた Column Chromatography で分割するのである。

III 回収率

Estrogen の抽出にさいして抽出操作によつて失われる部分のできることはある程度避けられない。そこで回収率が問題となる。実験の簡易性はともかくとして、実験過程で Estrogen が多量に失なわれると測定値の誤差が大になるので回収率は高い程よいのはいうまでもない。そこでわれわれの抽出法について次のような操作を行い回収率を検討した。すなわち、人尿200ccをとり、これを100ccづつに2分し、一方に Estrone, Estradiol をそれぞれXγ加え、一方は原尿のまま実験操作を同様に加えて第4表のように Estrogen 添加尿の純蛍光から原尿の純蛍光を差引いた値を

第4表 回収率

$$\frac{(A' - B') - (A - B)}{KX} \times 100$$

- A', B' 尿 100cc に Estrogen Xγ 添加操作し 435mμ Lampfilter を用いた時、及び 365mμ Lampfilter を用いた時の読み
- A, B 原尿 100cc をそのまゝ操作した時の読み
- K 結晶 Estrogen 1γ の蛍光値

結晶 Estrogen Xγ の純蛍光の値Kで割り、100を乗じたものを回収率として判定した。その結果は Estrone 55~60%, Estradiol 65~75% という比較的良好な成績を示した。なおこのさい、本法ではメチル化した Estrogen methyl ether の蛍光を測定しているわけ

であるので、厳密には結晶 Estrogen methyl ether の蛍光値を分母にしなければならないが、これは入手できなかつたので、やむなく結晶 Estrogen そのものの蛍光を対照として計算したが、大差ないものとみなされる。

IV 補正式

補正式は西谷がすでに報告したように簡単な補正式を用いた。すなわち次のようである。

$$\frac{\text{Unknown (A) - (B)}}{\text{Standard } 1/c(\text{A} - \text{B})} \times \frac{V}{100}$$

④…435m μ の Lamp filter を用いた時の読み

⑤…365m μ の Lamp filter を用いた時の読み

c…Standard として用いた結晶 Estrone の γ 値

V…24時間尿量 (cc)

すなわち、それぞれの蛍光の読みをわれわれの実験で算出した25.2 (Estrone), 48.7 (Estradiol) で除してこれに尿量を100で割った数値をかけて24時間尿の Estrogen γ 値を求めたのである。

小 括

われわれは Brown の方法に準じて若干検討、改良を加え、尿中 Estrone, Estradiol の分割測定を行ったが、要点は次のようである。

尿量は100ccを採り操作を加えて蛍光法に切換え、Estrone fraction には70% 硫酸1.0ccを加えて80°C20分加熱し65%硫酸14ccで稀釈し、また Estradiol fraction には70%硫酸1.0ccを加えて80°C20分加熱し60%硫酸14ccで稀釈して Pfaltz 製 Fluorophotometer で蛍光を測定し、西谷の報告したような簡単な補正式を

用いて24時間尿中 γ 値を算出した。また展開するに、アルミナ末はデシケーター中で完全に乾燥し、9%蒸溜水を加えて Estrogen を溶出させた。なお、展開液乾固のさい、沸騰石の小片を入れて乾固を速くしさらに吸引して完全乾固した。

第3章 尿中 Estrone, Estradiol 各分割の排泄値

尿中の Estrogen は Androgen と異なり、月経周期の間にかなり変動がいちじるしい。健康婦人でもすでに西谷の報告のように、排卵期に相当する時期と黄体完成期と思われる2つの時期に排泄増加が認められる。したがって閉経期以前の婦人について尿中の Estrogen を測定してその排泄状態を検討するためには、月経から月経までの全周期、もしくは少なくともいづれかのピーク時が観察できるように10日以上連続測定する必要がある。Estrone, Estradiol の各分割についても同様である。われわれは、まず健康な婦人について、1月経周期の全期間にわたって前項で述べた測定法で日々の尿中排泄値を連続測定した。このさい、測定件数を多くするために、2日間の尿をあわせて2日分の排泄量を測定した場合もある。また、被検者は家族、あるいは協同研究者の家族等によく知った健康婦人について採取した。また乳腺腫瘍患者はなるべく入院させて採尿し、早期に退院したものは、その家庭へ採尿に行つたのである。

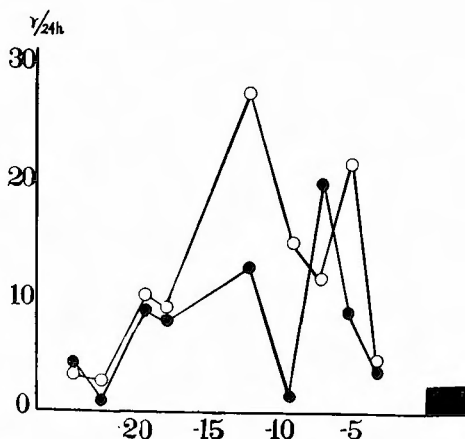
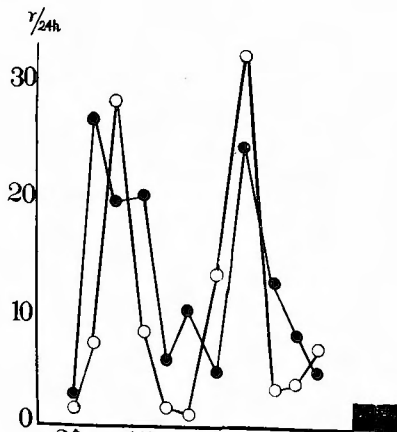
I 健康婦人

第12図 健康婦人の尿中 Estrone, Estradiol 排泄曲線

○—○ EO ●—● ED

例1. 27才

例2. 34才

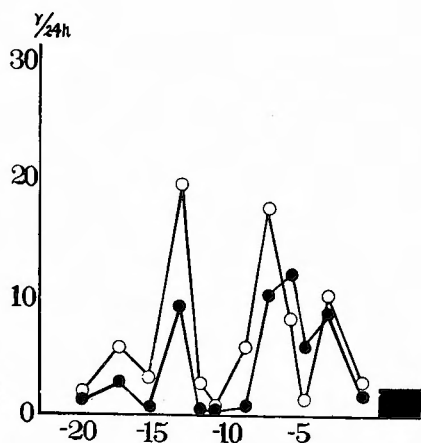
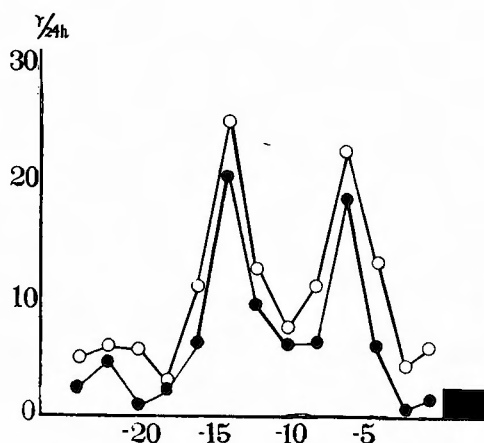


第13図 健常婦人の尿中 Estrone, Estradiol 排泄曲線

○—○ EO ●—● ED

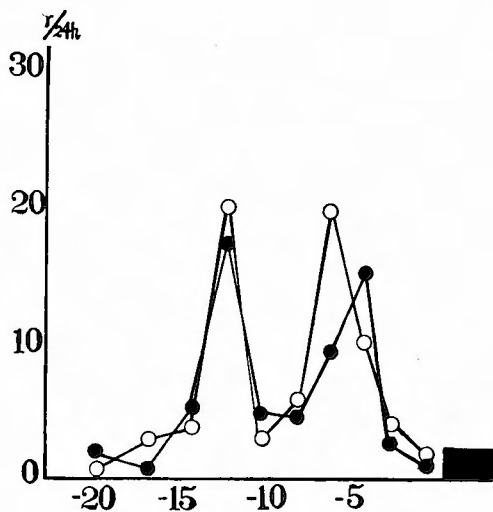
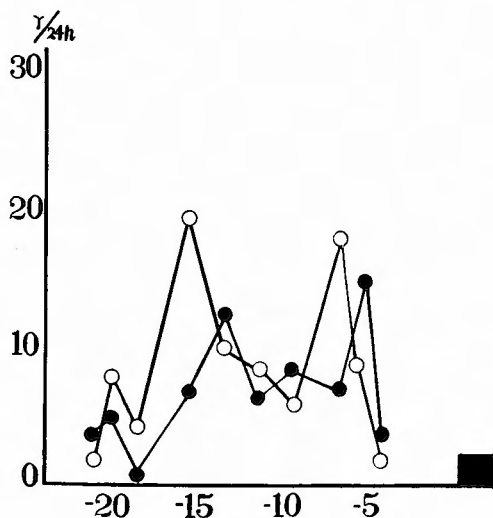
例4. 44才

例3. 26才



例5. 49才

例6. 23才



健常婦人の尿中 Estrogen は月経前と排卵期に相当する時期に2つの山をつくつて排泄されることは前述のようであるが、Jailer の生物学的測定法によると1日量はピーク時で60~100γ、それ以外の時期では5~20γであると報告している。しかしこの値は Estrone, Estradiol, Estriol 等の生物学的作用のあるものの全量が評価されているもので、従来の報告によると、Estriol は生物学的作用は Estrone, Estradiol に比べて少ないが、排泄量が多いとされている。西谷の報告によると Estrone, Estradiol を Estrone を基準とし

て測定した成績はピーク時で30~60γ、それ以外の時期では5~15γ前後である。

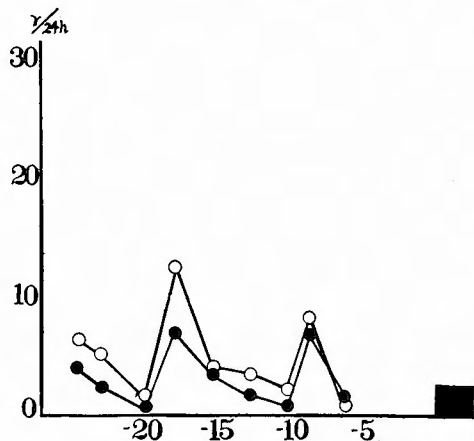
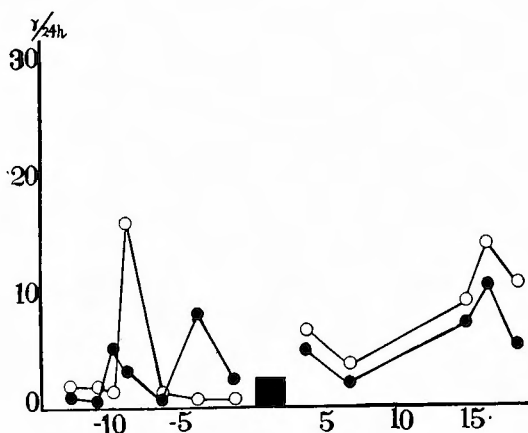
われわれの測定では健常婦人9例は第12図~第14図のように、大体典型的な排泄曲線を描き、これらのものについては、ピーク時の Estrone 値は15~40γ、Estradiol は10~20γであつた。なお白丸はEstrone、黒丸は Estradiol である。また日を追つて数値を示すと第5表のようである。すなわちEstrone, Estradiol とともに月経前14~17日、いわゆる排卵期に相当する山と、月経前7日頃、すなわち黄体期の山があり、また

第14図 健康婦人の尿中 Estrone, Estradiol 排泄曲線

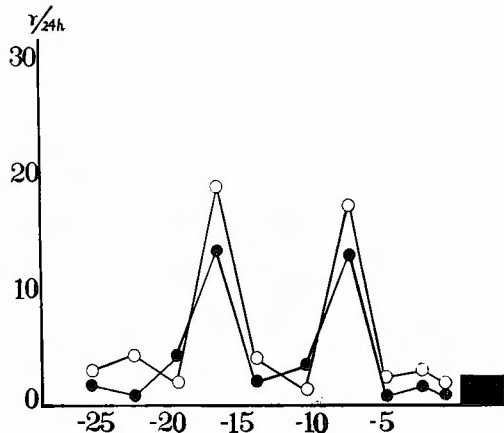
○—○ EO ●—● ED

例7. 25才

例8. 28才



例9. 48才

第5表 健康婦人の尿中 Estrone, Estradiol の排泄値 (数値は $\gamma/24h$)

年齢	月	日	日数																									
			27	26	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
○	27	EO																										
		ED																										
○	34	EO																										
		ED																										
○	26	EO																										
		ED																										
○	44	EO																										
		ED																										
○	49	EO																										
		ED																										
○	23	EO																										
		ED																										
○	25	EO																										
		ED																										
○	28	EO																										
		ED																										
○	38	EO																										
		ED																										

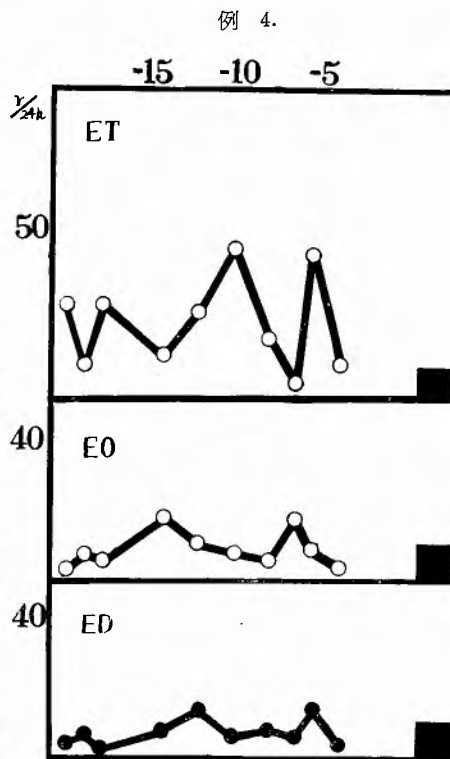
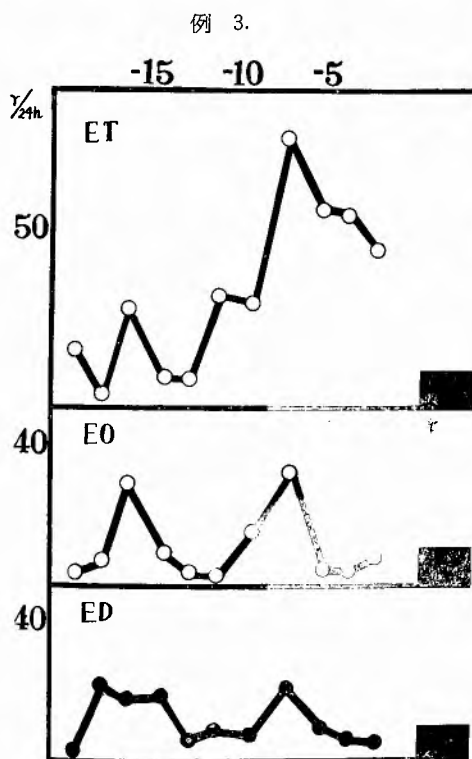
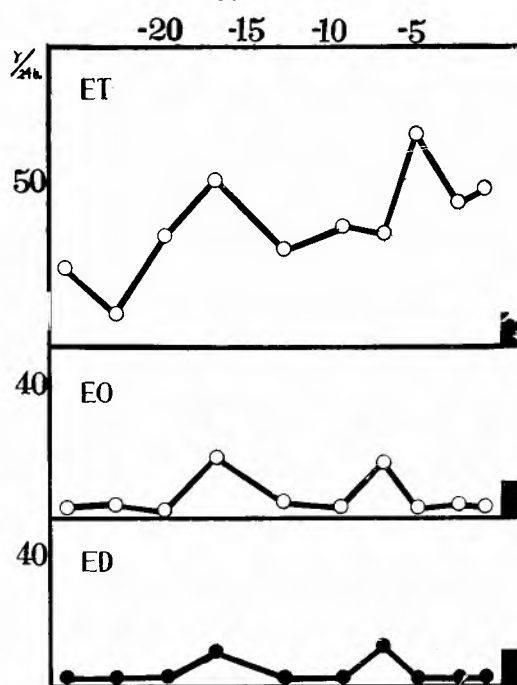
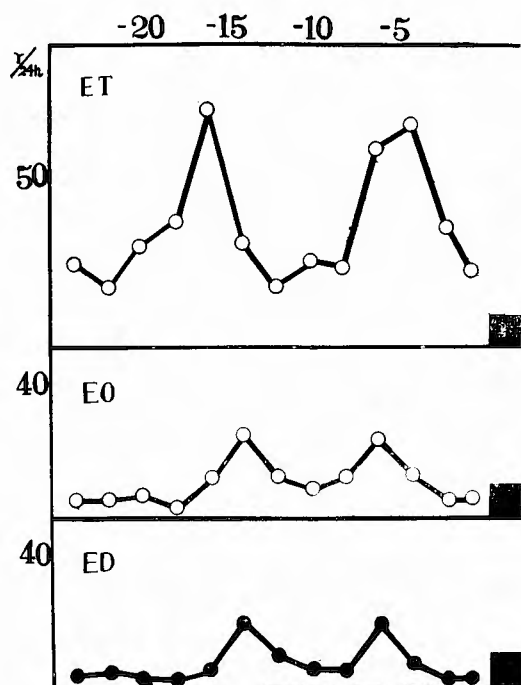
月経後7～8日頃に最低値を示すものが確かに多い。これはすでに西谷が報告した傾向と一致している。Estrone, Estradiolのピーク発現時は半数は一致し、半数は多少のずれを認める。すなわちEstroneの排泄値が増加している日にEstradiolの排泄値も増加しているとは限らず1～3日前後のずれのある場合がある。またピークはかなり急激に現われ、またすみやかに消退して曲線は深い谷を形成する傾向がある。9例の2つのピークの平均値はEstroneはやや卵胞期が高く平均20.4 γ 、黄体期は平均18.9 γ であり、Estradiolは黄体期が平均14.7 γ 、卵胞期が平均13.7 γ でありいちじるしい差は認められなかつた。また少数、月経中測定したものがあつたが、月経中ではやや増量するようである。

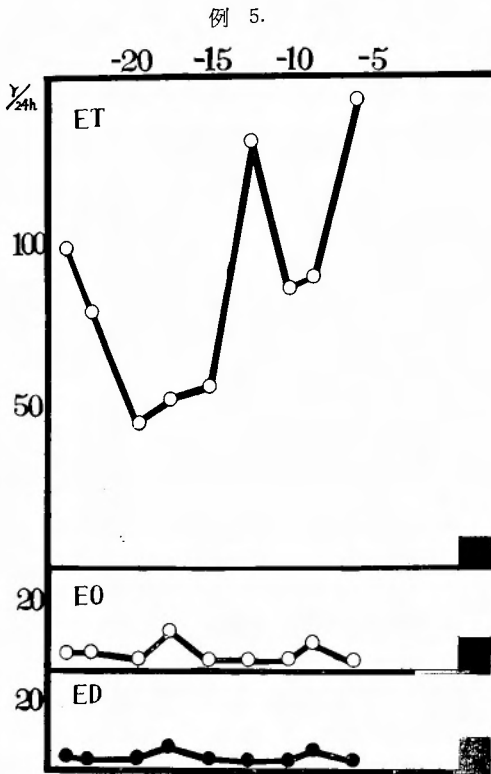
Estroneの排泄値とEstradiolの排泄値をくらべるとEstradiolの方がやや変動がいちじるしく、Estrone、Estradiolの総和はピーク時の値が20～50 γ のものが多く、77%をしめて西谷の報告とほぼ一致している。

また、2つのピークの発現時期についてはEstrone、Estradiolともに前期のピークが次の月経前15日を中心としてほぼ17～13日の間に発現し、前期のピークは次の月経前8～4日の間に発現するものが大部分であつたが、中には両ピークの発現が多少早かつたり、あるいは逆に遅かつたりしたもの少数ながら認められた。このような事実は排卵期、黄体完成期にはかなり個人差あるものであることを示している。

また、同じ対象について、協同研究者松井が測定し

第15図 健常婦人の尿中 Estrone, Estradiol, Estriol 排泄曲線
例 1. 例 2.





た Estriol の排泄値と Estrone, Estradiol のそれとを比較すると、ピークの発現時期が第15図、例1〜例3のように、大体において近い時期にあるが、全く同日のものばかりでなく1〜3日前後のずれのある場合が少

なくない。排泄値そのものについては、Estriol は Estrone, Estradiol に比べるといちじるしく多く、ピーク時で2〜5倍前後を示している。

また少数例では例4のように Estrone, Estradiol の排泄値曲線が正常ピークを示している時に Estriol は低値をつづけたり、逆に例5のように Estrone, Estradiol が比較的低い値をつづけている婦人で Estriol の排泄値だけが高い値であつて全く逆の傾向を示し、Estriol が Estrone, Estradiol およびその他の Steroid の代謝産物であるという説を裏づける場合もあつた。

一般的にいつて Estriol の排泄曲線に比べると Estrone, Estradiol は比較的定型的な排泄曲線を描いていたのである。

要するに、健常婦人の成績を総合すると、Estrone は10〜30γが89.0%をしめ、10γ以下はなく、また Estradiol は30γ以上のものはなく、10〜30γが78.0%、10γ以下が22.0%あつた。

また Estrone, Estradiol の総和は30γ以上が66.0%、30γ以下は33.0%をしめるが、大体20〜50γが多く77.0%をしめていた。

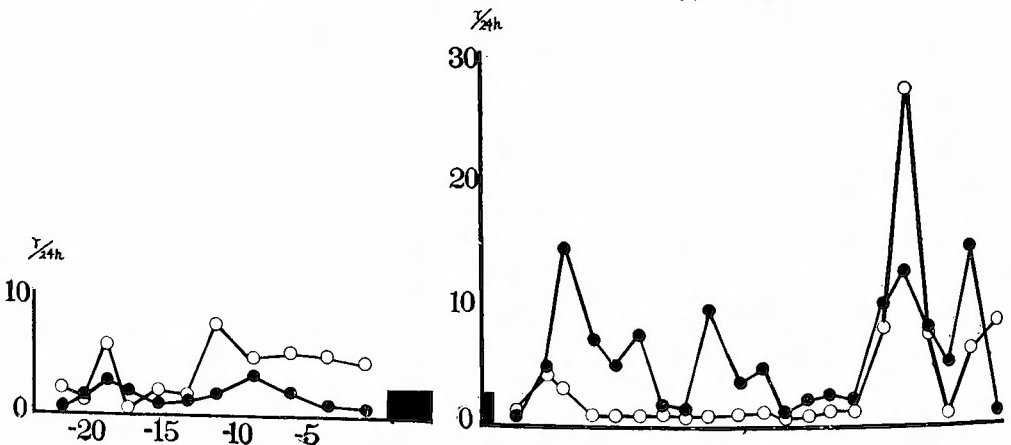
Estradiol の排泄値は諸家の報告より多いようであるが、これは大阪大学、松本氏の指摘したように Chromatography を Alumina 法で展開したさい、イオン交換樹脂法で行つたものより Estradiol 分割に多く混入する不純物、すなわち Kober 反応で510mμ附近の不純物のためと考えられるのである。

第16図 健常婦人の尿中 Estrone, Estradiol の非定型的排泄曲線

○—○ EO ●—● ED

例1. 30才

例2. 25才



また一応健常婦人であるが Anamnesis をみるとか、性腺系の異常があると考えられる2例は第16図、例1、例2のように不規則な曲線を描いた。例1は Estrogen 排泄値も低く、ピーク時の値もともに 10γ 以下で総和も 10γ に達しなかったが、本例は習慣性流産の傾向があり、月経は正常で規則正しく自覚的には健常であるが、内分泌学的には完全に健常とは認めがたいものである。例2は規則的な月経が今までであつて、月経終了後すぐに測定を開始したがその後月経をみないのであつて、これも卵巣機能の異常を示すものであろう。このように健常と思われる婦人でも尿中 Estrogen 値には多少差があることがわかる。

II 妊 婦

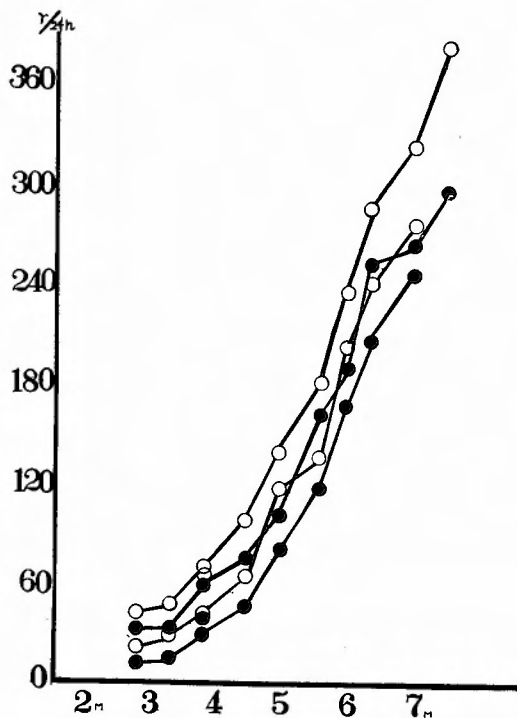
妊娠月令を追つて1例は3ヶ月のみ、1例は7ヶ月まで、1例は6ヶ月まで測定した。その成績は第17図のように Estrone は3ヶ月の終りではそれぞれ 70.2γ , 46.4γ , 62.0γ , 4ヶ月の終りでは 138.6γ , 118.2γ , 5ヶ月の終りでは 238.7γ , 201.2γ , 6ヶ月では 323.0γ , 277.3γ , 7ヶ月では 384.2γ であり、また Estradiol は3ヶ月の終りで 58.1γ , 29.1γ , 43.3γ , 4ヶ月の終りでは 102.6γ , 83.0γ , 5ヶ月の終りでは 188.2γ , 167.5γ , 6ヶ月では 263.2γ , 245.0γ , 7ヶ月では 297.4γ を示し、妊娠月数の経過とともに増加し、諸者の報告と一致した。

III マストパチー患者

われわれが測定したマストパチー患者21例はいづれも有経者である。その成績は第18図、例1～例3のように13例 (62%) は健常婦人と似た曲線を描いた。しかし8例 (38%) は第19図、例1、例2のように全く不規則な排泄曲線を描いた。正常曲線を描いたマストパチー患者13例の Estrone, Estradiol 値はともに $10\sim 30\gamma$ が多く、それぞれ85% (11例) と77% (10例) をしめ Estrone, Estradiol の総和は $20\sim 40\gamma$ のものが61.5% (8例) 認められたが、 50γ 以上のものは15.4% (2例)

第17図 妊婦の尿中 Estrone, Estradiol

○—○ EO ●—● ED



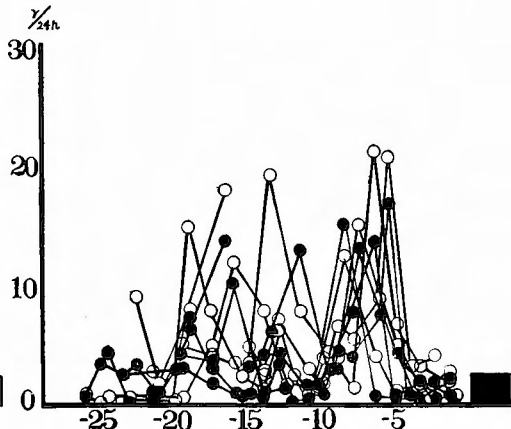
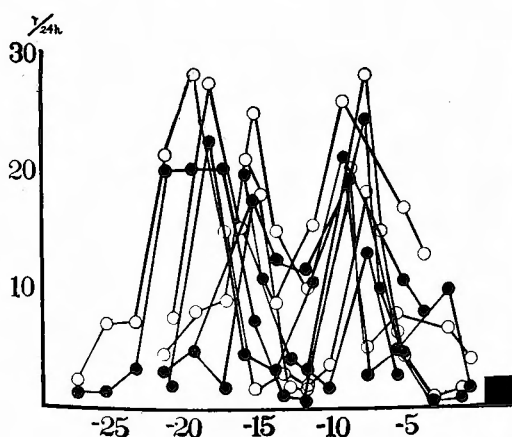
正常曲線を描いたマストパチー患者13例の Estrone, Estradiol 値はともに $10\sim 30\gamma$ が多く、それぞれ85% (11例) と77% (10例) をしめ Estrone, Estradiol の総和は $20\sim 40\gamma$ のものが61.5% (8例) 認められたが、 50γ 以上のものは15.4% (2例)

第18図 マストパチー患者の尿中 Estrone, Estradiol 排泄曲線

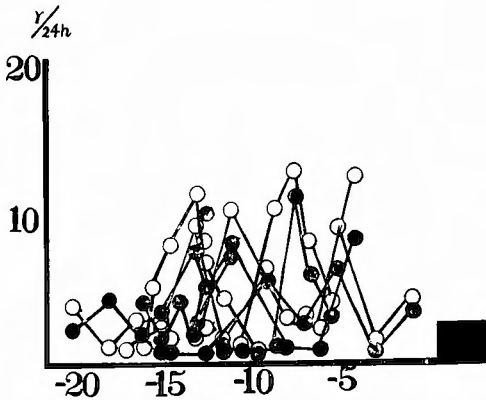
○—○ EO ●—● ED

例 1. (4例)

例 2. (4例)



例 3. (5例)



にすぎなかつた。すなわちピーク時の値でも健常婦人に比べてとくに排泄増加を示していないのであつて、西谷の報告と一致している。たゞ、西谷の報告に比べて排泄曲線の定型的なものの発現率がやや多いのであるが、西谷の測定法では Estrone, Estradiol の総和が曲線となつて現われているためであろう。また、Estrone, Estradiol のピークの発現時期は大体において健常婦人と同時期に現われているが、マストパチー患者では時期の早いものや、極端に遅いものの数がやや多くなつてゐる。これは性腺の機能的な障碍の現われであると考えられる。

また一方、不規則な曲線を描く 8 例では一般に

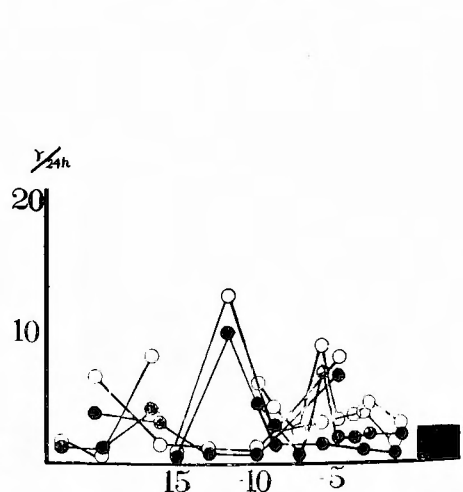
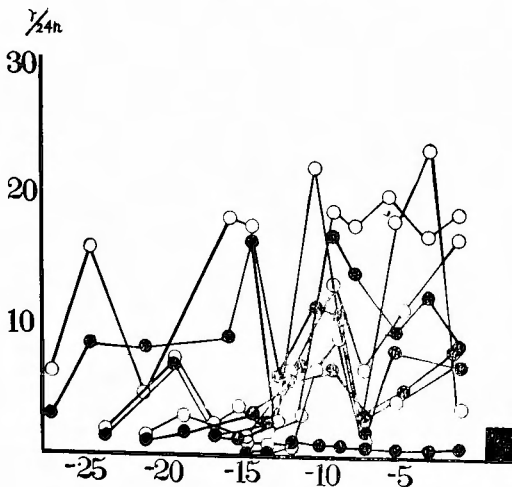
Estradiol の排泄が悪く、5 例は 10 γ 以下であり、とくに 1 例は Estrone は 20 γ 以上の値を示したが Estradiol はほとんど 0 に近い値を持続した。これらの 8 例では Estrone, Estradiol の総和も 40 γ 以上のものは認められなかつた。

また、Estrone, Estradiol 分割の排泄曲線と協同研究者松井が測定した Estriol のそれとを比較すると第20図、例 1~ 例 4 のように、健常婦人と同様に Estrone, Estradiol とともに Estriol の排泄値より極めて低く、ピークの発現のずれ、あるいは Estriol 排泄曲線の変動等の傾向も健常婦人の場合といちじるしい差を認めなかつた。

これらを総合すると、Estrone は 10~30 γ の範囲のものが 76% であり、Estradiol は 62%, また総和は 10 γ 以下のものはなく、10~40 γ が 85.7% (健常例は 59%), 40 γ 以上が 11.3% (健常例は 33.0%) であり、40 γ 以上のものは健常婦人例より低率を示している。したがつてマストパチー患者では Estrone よりも Estradiol の方が健常婦人に比べて排泄異常を示したものが多い。また両者ともとくに排泄過剰を示したものはなく、乳腺の増殖性的変化が Estrogen の絶対値の過剰だけによつてできるものではなく、Antagonist である Androgen の低下によつてもできることがあるという増田等の意見を裏付けるものである。マストパチー患者の Androgen の低下はすでに伊勢田が報告し、さらに協同研究者黒田が尿中 17KS の分割を測定し、性

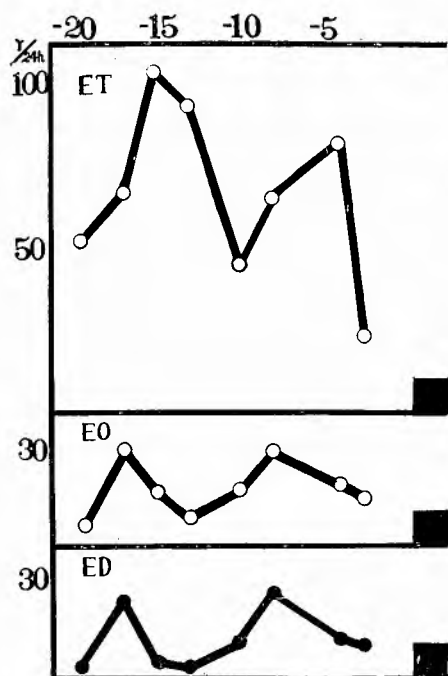
第19図 マストパチー患者の尿中 Estrone, Estradiol の非定型的排泄曲線

○—○ EO ●—● ED
例 1. (4例) 例 2. (4例)

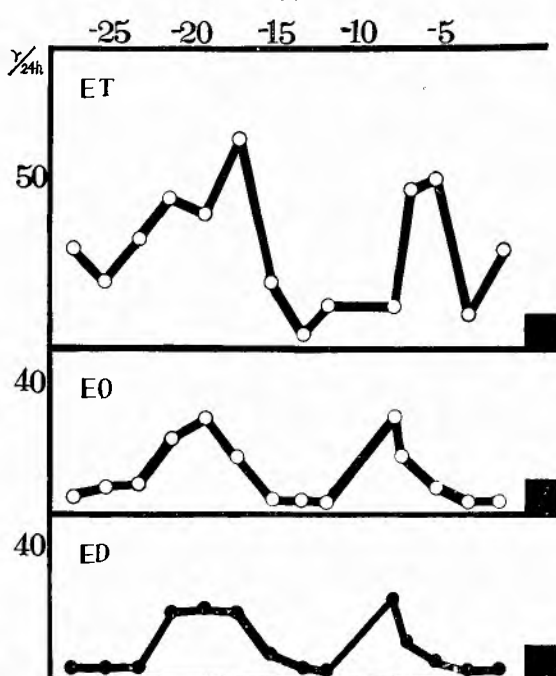


第20図 マストパチー患者の Estrone, Estradiol, Estriol 排泄曲線

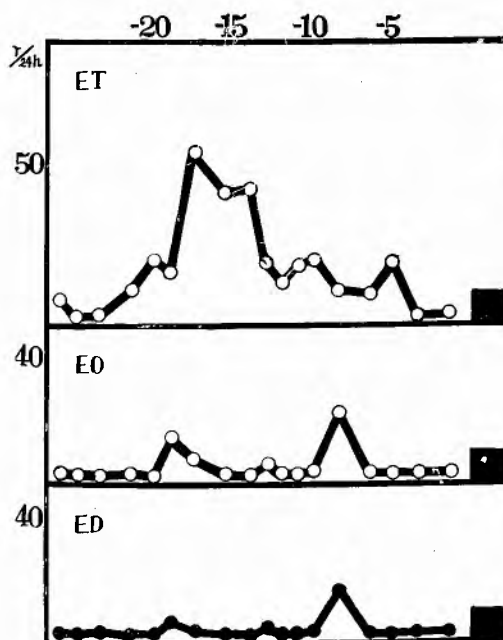
例 1.



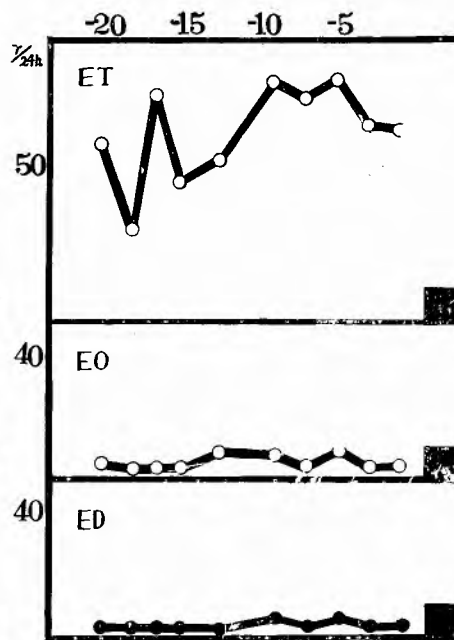
例 2.



例 3.



例 4.

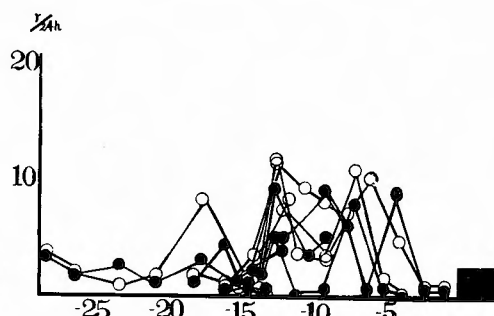
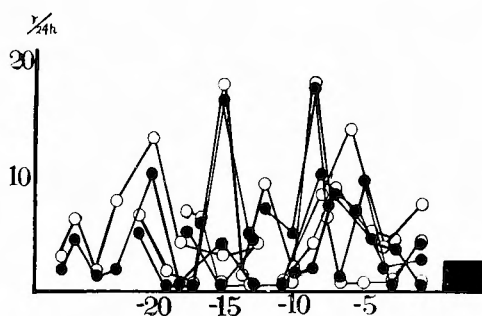


第21図 乳癌患者の尿中 Estrone, Estradiol 排泄曲線

○—○ EO ●—● ED

例 1. (3例)

例 2. (4例)

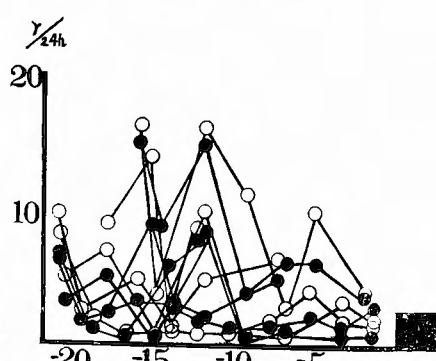
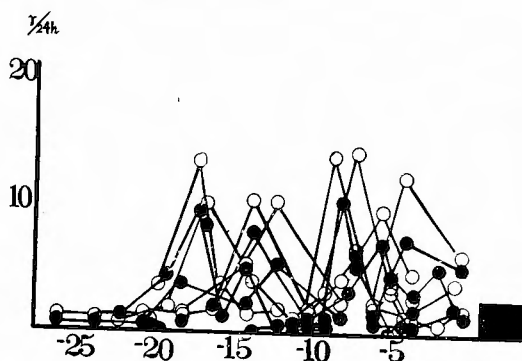


第22図 乳癌患者の尿中 Estrone, Estradiol の非定型的排泄曲線

○—○ EO ●—● ED

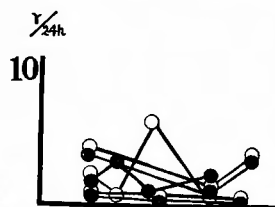
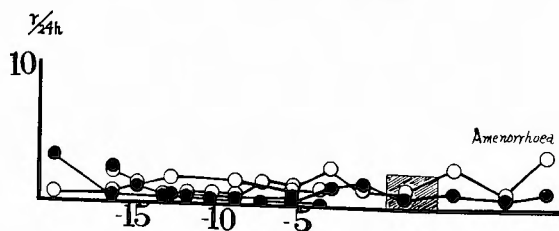
例 3. (5例)

例 1. (5例)



例 2. (2例)

例 3. (3例)



腺分割の低下しているのを認めたことによつて明らかである。

IV 乳癌患者

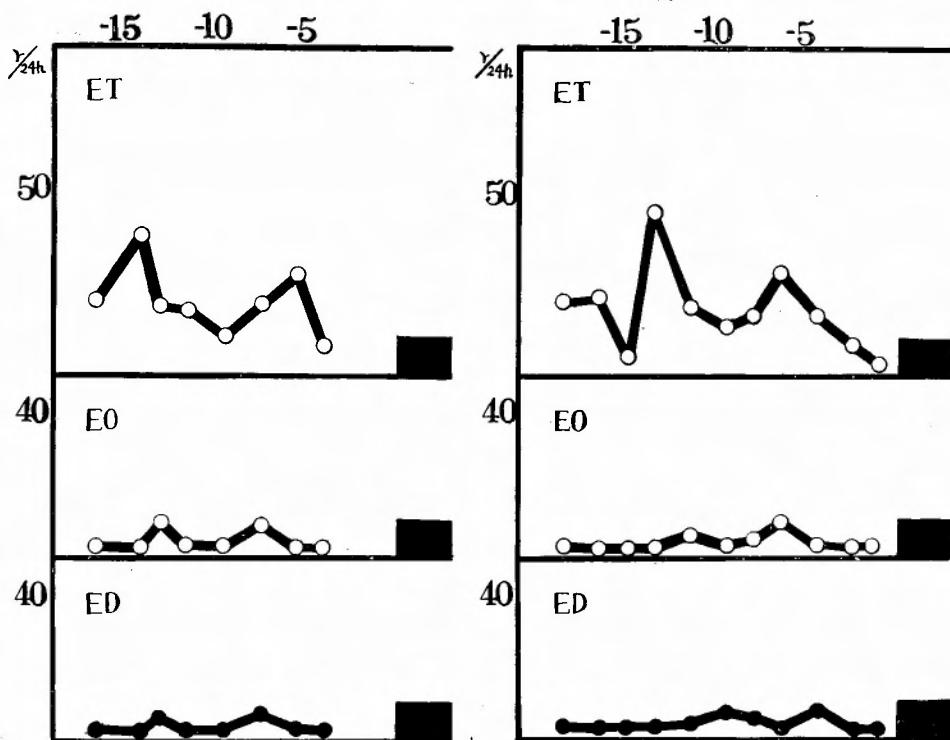
乳癌患者22例について測定したが、このうち、3例は閉経期の患者である。排泄曲線については22例中健常婦人と似たピークを描いたものは第21図、例1～例3のように12例(55%)で、10例は第22図、例1～例3のよ

うな不規則な曲線、または5以下の低値の連続を示した。

しかも、健常婦人に似た排泄曲線を描いた12例もピーク時の排泄値の平均は Estrone, Estradiol とともに20以下であり、とくに Estradiol は9例(75%)が10以下であつた。また両者の総和も10～35.3であつた。

また、ピークの発現時期も健常婦人に比べると排卵

第23図 乳癌患者の尿中 Estrone, Estradiol, Estiol 排泄曲線
例 1. 例 2.



期と黄体完成期の間隔が開き過ぎたり、近過ぎたりするものの数が多く、性腺機能の障害を示唆している。

また不規則な排泄曲線を示した 10 例は Estrone, Estradiol はともに 20 γ 以下で、10 γ 以下のものが Estrone で60%, Estradiol で90%を示し、総和でも 30 γ 以上のものは 20% (2 例) に過ぎないが、ことに 10 γ 以下のものが 50% (5 例) あつた。しかしこのうち 3 例は閉経期(平均年齢 57.6 才)で当然といえるかもしれないが、他の 2 例は全くの Hypoestrogenism の状態であつた。

また同時に、協同研究者松井が測定した Estriol の排泄曲線と比較すると、第23図、例1～例5のように、Estriol 値も乳癌患者では低く、大体において Estrone Estradiol の傾向と似ていたが、やはりピーク発現時は多少のずれが認められた。Estrone, Estradiol が不規則な曲線を示した場合は Estriol も不規則な曲線を描いたのである。

要するに、乳癌患者では Estrone, Estradiol のピーク時排泄量はいずれも 20 γ 以下であり、ことに 10 γ 以下は Estrone では 50%, Estradiol では 82%をし

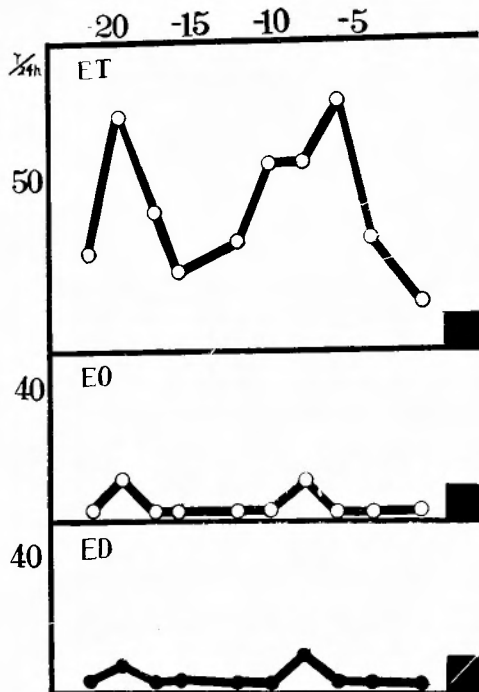
め、総和でも 30 γ 以上は 13.6% (3 例)、また他はすべて 20 γ 以下で Estrogen の排泄低下が著明であつた。この成績も西谷の報告とほぼ一致している。

小 括

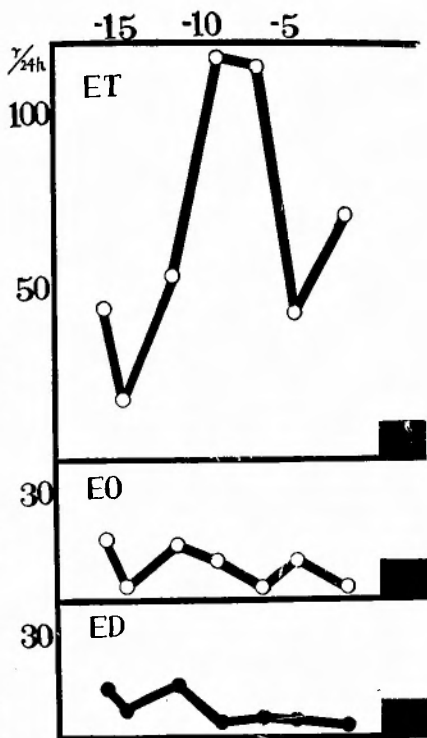
以上の成績から、健常婦人に比較して、第6表、第7表のように、マストバチー患者、乳癌患者ともに尿中 Estrone, Estradiol 各分割の排泄値は、決して排泄過剰という傾向は認められないで、むしろ低いものがあり、しかも排泄曲線の不規則なものが多い。しかもこの傾向はマストバチー患者より乳癌患者の方にいちぢるしい。これはさきに西谷が Estrone, Estradiol の総和を測定した成績とよく一致している。

すなわち、Estrone, Estradiol の各分割を別々に測定しても、やはり同様の傾向を認めたのである。またマストバチー患者においては、Estrone よりも Estradiol 分割の方が排泄異常を示した場合が多い。Estradiol の排泄量は Estrone に比べて少ないことが多いが、その発情作用は強力である点から考えて、マストバチーの発生に重大な役割をはたしているものであろう。しかし、排泄過剰ではなく、むしろ低下してい

例 3.



例 4.



るのであるから、卵巣機能の昂進を示すものではなく Dysfunctionを示すものであろう。

また、マストバチーの組織像には、増殖性変化と萎縮性変化が混在しているが、その増殖性変化も Estrogen の絶対的な過剰によるだけでおこるのではなく antagonist である Androgen の低下、ひいては下垂体ホルモンの分泌異常等が相俟つて相対的な Estrogenism となり、mammogenic な Hormone の分泌などによっておこることがあると考える。

事実、マストバチー患者ではすでに伊勢田が報告したように、17KS 値の尿中排泄低下が多く、協同研究者黒田が 17KS の分割中、性腺分割の低下するものが多いことを指摘したことなどを考えあわせると、われわれのえた Estrone, Estradiol の排泄値は性腺系の Dysfunction の一面を示しているものであろう。

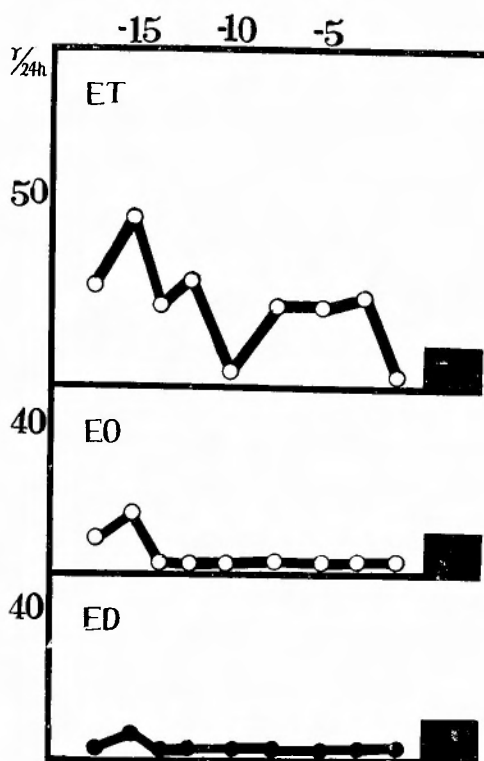
総括および考察

乳腺腫瘍患者の尿中 Estrogen 排泄値に関しては、すでに欧米では Wanke, Tayler, Bucher and Geschickter, Nathanson 等、わが国では増田、西谷、藤森

山本等が報告しているが、その成績は必ずしも一致していない。Wanke はマストバチー患者の尿中 Estrogen の排泄値は低下していると報告しているのに対して、Tayler, Bucher and Geschickter 等は健康婦人との間にいちじるしい差違を認めないとし、Nathanson は排泄値よりもその排泄曲線に不規則なものがあることを認めている。また、藤森は血中の Estrogen 値が高いものが多いと報告し、山本は尿中 Estrogen 排泄値が高いものが多いと報告している。教室の増田、西谷等は尿中の Estrogen 排泄値は高いものは少なく、正常範囲または低いものが多い、排泄曲線の不規則なことを注目している。

このような意見の差は血中、尿中いずれも Estrogen の量が非常に微量であることと、測定方法が異なることによるものと考えられる。しかも、以上の報告はいずれも Estrogen 全体としての生物学的作用による測定法や、Estrone を示標にして Estrone, Estradiol の総和を測定したものであつて、Estrone, Estradiol, Estrinol の各分割について月経周期の全期間にわたつて連日測定したものは見当たらない。そこでわれわれは

例 5.



Estrogenの各分割を測定することにしたのであるが、そのうち、Estrone, Estradiol を担当したのである。

そして前述のように、Brown の抽出法を改良して比較的良好な回収率を得て乳腺腫瘍患者、なかんづくマストパチー患者、乳癌患者の尿中 Estrone, Estradiol の消長を観察したのであるが、次のような結果を得た。

乳腺腫瘍患者全体を通じて、Estrone, Estradiol の

第7表 健常婦人と乳腺腫瘍患者の尿中 Estrone, Estradiol のピーク時排泄値と例数 (%)

		γ/24h	0~10	~20	~30	~40	~50	~60
Estrone	健 常		0 %	56.0	33.0	11.0	0	0
	マストパチー		24.0	43.0	33.0	0	0	0
	乳 癌		50.0	50.0	0	0	0	0
Estradiol	健 常		22.0	67.0	11.0	0	0	0
	マストパチー		38.0	48.0	14.0	0	0	0
	乳 癌		82.0	18.0	0	0	0	0
Totals	健 常		0	11.0	22.0	33.0	22.0	11.0
	マストパチー		0	23.8	47.6	14.3	4.8	9.5
	乳 癌		22.7	45.5	18.2	13.6	0	0

第6表 健常婦人、乳腺腫瘍患者の尿中 Estrone, Estradiol のピーク時排泄値 (例数)

		γ/24h	0~10	~20	~30	~40	~50	~60
健常婦人	正常曲線	9	EO	0	5	3	1	0
	例		ED	2	6	1	0	0
			T	0	1	2	3	2
マストパチー患者	正常曲線	13	EO	2	7	4	0	0
		例	ED	3	7	3	0	0
			T	0	2	7	1	2
	不定型曲線	8	EO	3	2	3	0	0
		例	ED	5	3	0	0	0
			T	0	3	3	2	0
	計	21	EO	5	9	7	0	0
		例	ED	8	10	3	0	0
			T	0	5	10	3	2
乳癌患者	正常曲線	12	EO	5	7	0	0	0
		例	ED	9	3	0	0	0
			T	0	7	4	1	0
	不定型曲線	10	EO	6	4	0	0	0
		例	ED	9	1	0	0	0
			T	5	3	0	2	0
	計	22	EO	11	11	0	0	0
		例	ED	18	4	0	0	0
			T	5	10	4	3	0

2つともに排泄過剰を認めたものはごく少数に過ぎなかった。

マストパチー患者では排泄曲線の定型的なものの発現率は62%であり、ピーク時の値でもとくに排泄増加

を示さず, Estrone, Estradiol はともに10~30%, 総印では20~40% のものが多く, またピーク時の発現時期の早いものや遅いものの数が健常婦人よりやや多い。他の38%は排泄曲線は非定型的で一般に Estradiol の排泄が悪く, その半数以上は10%以下であり, 無排卵性の卵巣機能不全を思わせた。また, 総合的にみて Estroneより Estradiolの方が健常婦人に比べて排泄異常を示したものが多く, さらに Estriol の排泄曲線と比較するとピークのずれや排泄曲線の変動等も健常婦人と著明な差を認めなかつた。

乳癌患者の排泄曲線の定型的なものの発現率は55%であるが, Estrone, Estradiol の排泄値はともに20%以下であり, とくに Estradiol の75%が10%以下で, 総和も10~30%のものが95%をしめ, またピークの発現時期も健常婦人に比べて排卵期, 黄体完成期の間隔が開き過ぎたり近過ぎたりするものの数が多く, 性腺機能の障害を示している。不規則な排泄曲線を描いた45%のものは, Estrone の60%, Estradiol の90%がいつも10%以下であり, 総和も20%以下が80%, 10%のものが50%しめている。さらに, Estriol の排泄曲線と比較すると, Estriol 値も低く, やはり多少のずれを認めた。総合的にみると Estrogen 排泄低下が著明であつた。

以上の結果からすると, 教室の増田等のように乳腺腫瘍患者の性腺には確かに機能的, 器質的の変化があり, その組織像からして恐らく脳下垂体・性腺系ホルモンのアンバランスが発現して, それが乳腺に対して時には増殖, 時には萎縮の方向に不規則な刺激として反復して腫瘍性変化がおくるという考えが, 立派にここでも裏付けられたものと考えられるのである。

結 語

われわれは健常婦人9例, マストパチー患者21例, 乳癌患者22例, 合計52例の婦人尿中の Estrone, Estradiol 分割を分割測定したが, マストパチー患者では Estrone, Estradiol がともにいちじるしい排泄過剰を示したものは少なく, 正常範囲もしくはやや低い値を示し, 排泄曲線が不規則なものが多かつた。

乳癌患者では極度の排泄障害が認められ, しかも Estrone よりも Estradiol の方に排泄異常が多く認められた。

本論文の要旨の一部は第31回日本内分泌学会において発表した。

稿を終るに臨み, 終始御懇切な御教示を賜つた教室

増田強三講師に謹んで深く感謝致します。また本研究にあたり貴重な器具 Fluorophotometer の使用を許され, かつ御教示をえた京都大学衛生学教室三浦運一教授, 藤原元典助教授に感謝するとともに, ホルモン剤および種々の援助をいただいた帝國臓器株式会社に謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) Allen, E. & Doisy, E. A.: An Ovarian Hormone; Preliminary Report on its Localisation, Extraction and Partial Purification and Action in Test Animals. *J. A. M. A.*, **81**, 819, 1923.
- 2) 浅野繁: 尿中 Estrone, Estradiol および Estriol の化学的測定法. *内分泌*, **1**, 522, 1954.
- 3) Bates, R. W. and Cohen, H.: Experimental Basis for Selecting the Optimal Conditions for Quantitative Fluorometry of Natural Estrogens. *Endocrinol.*, **47**, 166, 1950.
- 4) Bates, R. W. and Cohen, H.: Fluorescence Spectra of Natural Estrogens and their Application to Biological Extracts. *Endocrinol.*, **47**, 182, 1950.
- 5) Bauld, W. S.: Separation of Oestrogens in Urinary Extracts by Partition Chromatography. *Bioch. Journal*, **59**, 294, 1955.
- 6) Bierry, H. et al.: Detection des hormonesoestrogens, Laus l'urine de la femme enceinte, par une reaction de fluorescence. *Compt. rend, Soc. de biol.*, **122**, 147, 1936.
- 7) Bierry, H. et al.: Extraction et detection Spectrale de l'oestriol dans l'urine de la femme enceinte. *Compt. rend, Soc. de biol.*, **124**, 320, 1937.
- 8) Braunsberg, H.: The Fluorimetric Determination of Estrogens. *J. Endocrinol.*, **8**, 11, 1952.
- 9) Brown, J. B.: Some Observation on the Kober Colour and Fluorescence Reactions of the Natural Estrogens. *J. Endocrinol.*, **8**, 196, 1952.
- 10) Brown, J. B.: A Chemical Method for the Determination of Oestriol, Oestrone and Oestradiol in Human Urine. *Bioch. Journal*, **60**, 700, 1955.
- 11) Brown, J. B. et al.: The Urinary Excretion of Oestrogens, Pregnadiol and Gonadotrophins during the Menstrual Cycle. *The G. of Endocrinol.*, **17**, 401, 1958.
- 12) Bucher, N. L. R. and Geschickter, C. F.: Corpus Luteum Studies. II. Pregnadiol and Estrogen Output in the Urine of Patients with Chronic Mastitis. *J. Clin. Endocrinol.*, **1**, 58, 1941.

- 13) Engel, L. L. et al.: The Separation of Natural Estrogens by Counter Current Distribution. *J. B. C.*, **185**, 255, 1950.
- 14) Escher, G. C.: Hormone Therapy in advanced Mammary Carcinoma. *The Med. Clin. North. America*, **36**, 681, 1952.
- 15) Finkelstein, M. et al.: Estimation of Steroid Estrogens by Fluorimetry. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **64**, 64, 1944.
- 16) Finkelstein, M.: Microdetermination of Steroid Estrogen in Urine by Fluorometry. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **69**, 181, 1948.
- 17) Friedgood, H. B. et al.: A New Method for the Separation of Androgens from Estrogens and for the Partition of Estrinol from Estrone-Estradiol Fraction. *J. B. C.*, **174**, 523, 1948.
- 18) 藤森正雄: 前癌性変化としての慢性乳腺症とその内分泌変調. 治療, **36**, 29, 昭29
- 19) Iseda, Y.: Endocrinological Studies on Neoplastic Diseases of the Breast in the Light of the Excretion of Urinary 17-Ketosteroids. *Arch. für Jap. Chir.*, **25**, 443, 1956.
- 20) Jailer, J. W.: A Fluorometric Method for the Clinical Determination of Estrone and Estradiol. *J. Clin. Endocrinol.*, **8**, 564, 1948.
- 21) Jailer, J. W.: The Metabolism of the Estrogens. *J. Clin. Endocrinol.*, **8**, 564, 1949.
- 22) Kier, L. S. et al.: Endocrine Relationships in Benign Lesions of the Breast. *Ann.Surg.*, **135**, 782, 1952.
- 23) 小林賀雄: 産婦人科領域に於ける尿中エストロゲン殊にその分割の意義について. 日産雑誌, **8**, 1457, 昭31.
- 24) Kober, S.: Eine Kolorimetrische Bestimmung des Brusthormons. *Biochem. Ztschr.*, **239**, 209, 1931.
- 25) 越哲也, 他.: テストステロンの乳腺に及ぼす影響. 日内分泌誌, **32**, 190, 1956.
- 26) Marrian G. F. et al.: The Isolation of Epioestrinol from the Urine of Pregnant Women. *Biochem. J.*, **59**, 136, 1955.
- 27) 増田強三, 武田進, 西谷奎吾, 伊勢田幸彦: マストパチート性ホルモン. 診療, **6**, 891, 昭28.
- 28) 増田強三, 西谷奎吾: エストローゲンの化学的定量法. 最新医学, **9**, 1, 昭29.
- 29) 増田強三: 乳癌と性ホルモン. ホルモンと臨床, **3**, 1203, 1955.
- 30) 増田強三: 乳腺腫瘍と卵巣副腎皮質の関係. 癌の臨床, **2**, 459, 1956.
- 31) 増田強三: 乳腺腫瘍と性ホルモン. 日本臨床, **14**, 1522, 1956.
- 32) 増田強三: 乳癌及びマストパチーのホルモン療法. 総合医学, **13**, 1195, 昭31.
- 33) 増田強三: Mastopathie. 内分泌のつどい, **8**, 346, 1956.
- 34) 増田強三: 乳腺腫瘍の形態発生と内分泌. 臨床外科, **12**, 1522, 1957.
- 35) 増田強三: 乳癌と乳腺症 (マストパチー). 診療, **10**, 972, 昭32
- 36) 森茂樹: ステロイドホルモンと腫瘍. ホルモンと臨床, **4**, 303, 1956.
- 37) Nathanson, I. T.: The Relationships of Hormones to Diseases of the Breast. *Endocrinology of Neoplastic Disease*, **138**, 1947, Oxford Univ. Press, New York.
- 38) Nathanson, I. T.: Hormonal Treatment in Cancer. *Med. Chin. North A.*, **34**, 1409, 1950.
- 39) Nishiya, K.: Endocrinological Studies on Neoplastic Diseases of the Breast in the Light of the Excretion of Urinary Estrogens. *Arch. für Jap. Chir.*, **26**, 249, 1957.
- 40) 落合京一郎: 発癌と性ホルモン, 特に発情ホルモン. 日本臨床, **3**, 697, 1954.
- 41) Pearlman, W. H. et al.: Estrogen Metabolism in Human Pregnancy. A Study with the Aid of Deuterium. *J. of Biolog. Chemistry*, **209**, 803, 1954.
- 42) Procter, I. M. et al.: The Relation of Chronic Cystic Mastitis to Malignancy. *Surg. Gynec. & Obst.*, **70**, 671, 1940.
- 43) Ross, M. and Dorfman, R. I.: The Urinary Excretion of Estrogens and Androgens by Women with Carcinoma of the Breast. *Cancer Research*, **1**, 52, 1941.
- 44) Saltzstein, H. C. et al.: Benign Tumors of the Breast. *J. A. M. A.*, **140**, 997, 1949.
- 45) Shimkin, M.: Hormones and Neoplasma. *Cancer*, **1**, 161, 1957.
- 46) Stimmel, B. F.: Utilization of a Color Correction Equation with the Kober Reagent for the Estimaion of the Estrogens in Human Urine with Low Estrogen Content (Abstract). *J. B. C.*, **165**, 73, 1946.
- 47) Stimmel, B. F.: The Effect of Zinc-Hydrochloric Acid Hydrolysis on the Estrogens in Human Urine. *J. B. C.*, **178**, 217, 1947.
- 48) 鈴木雅洲, 森滋: 尿中 Estrone, Estradiol および Estrinol の化学的測定法. 内分泌, **1**, 522, 1954
- 49) 鈴木雅洲: Estrogen の化学的測定法特に Chromatography について. ホルモンと臨床, **4**, 546, 1956.
- 50) Taylor, H. C.: The Relation of Chronic Mastitis to Certain Hormones of the Ovary and Pituitary and to Coincident Gynecological Lesions; Part II, Chincinal and Hormone Studies. *Surg. Gynec. & Obst.*, **62**, 562,

- 1936.
- 51) Venning, E. et al.: The Determination of Estrin in Urine with the Photoelectric Colorimeter. *J. B. C.*, **120**, 225, 1937.
- 52) Wanke, R.: Die Mastopathia chronica in Neueren Betrachtung. *Deutsch. Zeitschr. Chir.*, **250**, 234, 1938.
- 53) Willibald Pschyrembel und Günter Halder : Ein neues Verfahren zur gestrennten Bestimmung der Oestrogen Hormone auf der Grundlage des Kober Testes. *Nature*, **306**, 154, 1959.
- 54) 山本武：乳腺腫瘍に関する研究. 第三篇, 乳腺腫瘍の内分泌学的研究特に性ホルモンの関係. *名古屋市大医学会雑誌*, **7**, 66, 昭31.